

蓝莓多糖 BBP3-1 的分离及结构分析

孙希云¹, 刘宁², 孟宪军^{1*}, 李斌¹, 张琦¹

¹沈阳农业大学食品学院; ²沈阳农业大学土地与环境学院 沈阳 110161

摘要: 采用酶法优化进行水提醇沉得到蓝莓粗多糖。经双氧水脱色、酶解和三氯乙酸正丁醇结合法脱蛋白后通过 DEAE Sepharose Fast Flow 离子交换层析和 sephacryl s-300 HR 凝胶过滤层析得到蓝莓多糖(BBP3-1)。经紫外扫描显示无蛋白、核酸杂质。经高效液相色谱分析, BBP3-1 的重均分子量 M_w 为 18643 Da, 数均分子量 M_n 为 9658 Da, 峰位分子量 M_p 为 3554 Da, 分子量分布宽度(M_w/M_n) 为 3.186。气相色谱分析确定单糖组成为: 鼠李糖、半乳糖和葡萄糖, 其摩尔比为 1:1.5:2。经红外光谱和核磁共振分析, 可推测多糖 BBP3-1 是以 1,6 连接的吡喃葡萄糖链为主链, 含有鼠李糖、半乳糖、葡萄糖和糖醛酸, 不含甘露糖的 β 构型酸性多糖。

关键词: 蓝莓; 多糖; 分离; 结构

中图分类号: R28412; Q946191

文献标识码: A

Separation and Structural Analysis of Polysaccharides BBP3-1 from Blueberry

SUN Xi-yun¹, LIU Ning², MENG Xian-jun^{1*}, LI Bin¹, ZHANG Qi¹

¹Shenyang Agriculture University, College of Food; ²Shenyang Agriculture University, College of Land and Environmental Science, Shenyang 110161, China

Abstract: In this study the raw polysaccharide was obtained from Blueberry by hot water extraction and ethanol precipitation method coupled with pectinase optimum. Then it was discolored by H_2O_2 , enzymatic hydrolyzed and then removed of protein by combining trichloroacetic acid and n-butanol. Polysaccharide(BBP3-1) was purified using DEAE Sepharose Fast Flow ion exchange chromatography and Sephacryl S-300 HR gel filtration chromatography(GFC). UV spectra measurements confirmed there was no protein and nucleic acid. HPLC analysis showed that the average molecular weight (M_w) was 18643Da, the numerical average weight(M_n) was 5851 Da, the peak molecular weight(M_p) was 3554 Da, the width of molecular weight (M_w/M_n) was 3.186. GC analysis showed that the polysaccharide BBP3-1 was composed of GalUA, Xyl and Glu with a molar proportion of 1:1.5:2. The IR and NMR spectrum analysis indicated the chain of the polysaccharide BBP3-1 was dominant by 1,6-glucopyranose chain. It was an acidic β polysaccharide containing GalUA, Xyl, Glu and Rha but without Man.

Key words: blueberry; polysaccharide; isolation; structure

蓝莓(Blueberry), 学名越桔, 为杜鹃花科(Ericaceae)越桔属(*Vaccinium* spp.)多年生落叶或常绿果树, 呈灌木。该属植物在全世界有 450 种, 中国已知有 91 种, 南北方均有野生资源分布, 但主要分布在西南、华南及东北地区^[1]。近年来, 加拿大、日本和欧洲的很多国家都把蓝莓视为保健与功能食品, 倍受人们青睐。在英国权威营养学家列出的全球 15 种健康食品中蓝莓食品居首位, 在联合国粮农组织列出的人类五大健康食品中蓝莓食品是其中之一。

因此 20 世纪后期, 蓝莓(blueberry)正是以其独特的保健营养价值在国外市场上引起广泛的重视和应用, 成为目前热门的开发产品之一。我国对于蓝莓的研究目前还主要集中在引种栽培和产品的初加工方面^[1, 2]。

近几十年来, 人们发现从植物中提取的多糖具有非常重要与特殊的生理活性, 具有抗肿瘤和免疫促进、抗炎、抗病毒、抗凝血、降血糖、降血脂、抗疲劳、抗衰老等作用。目前国内外对于浆果类果实中活性多糖构效关系方面的研究还相对还较少^[3], 特别是对于蓝莓果中多糖结构及功能性方面的研究还未见报道。本文对蓝莓中多糖的分离、结构进行了初步研究, 为进一步研究其生理活性和产品开发奠

收稿日期: 2010-03-30 接受日期: 2010-09-10

基金项目: 辽宁省主要浆果深加工项目(辽宁省科技厅项目(1102-01082609001); 特色小浆果精加工关键技术研究(辽宁省科技厅科技攻关项目)(2011205001))

* 通讯作者 Tel: 86-24-88488277; E-mail: mengxjsy@126.com

定基础,同时也为浆果类资源的综合开发利用提供了新的思路和途径。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

蓝莓 购于辽宁蓝金实业有限公司,品种为北蓝;果胶酶(分析纯),木瓜蛋白酶(分析纯),为国药集团化学试剂有限公司;DEAE-52 纤维素,购于 Whatman 公司;Sephacryl S-300,购于 GE Healthcare 公司;牛血清蛋白(生化试剂),购于北京奥博星生物试剂公司;考马斯亮蓝 G-250(Fluka) 购于上海化学试剂公司;蓝色葡聚糖,葡聚糖-90,葡聚糖-70,葡聚糖-40,葡聚糖-10,色谱级,购于瑞典 Pharmacia 公司;透析袋(分子截流量为 14000 Dal,美国);化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

UV-1100 紫外可见分光光度计,上海分析仪器厂;高效液相色谱仪,RID-10A 视差折射鉴定器,CLASS-Vp(软件)工作站,均为日本 Shimadzu 公司;Tensor 27 傅立叶红外光谱仪,德国布鲁克公司;BrukerAV-600 超导核磁共振仪,瑞士 Bruker;Agilent 6890N GC,美国安捷伦科技有限公司。

1.3 样品制备方法

1.3.1 粗多糖提取工艺

称取干燥至恒重的一定条件下粉碎的蓝莓 10 g,溶于一定体积的蒸馏水中,加入 0.6% 果胶酶,在一定温度的水浴中浸提并不断搅拌,取出后再以 3000 r/min 离心 10 min,弃去下层不溶物,取上清液,加入无水乙醇至乙醇浓度为 80%,冰箱中静置过夜,取出,以 3000 r/min 离心 10 min,取沉淀,先后用丙酮、乙醚和乙醇冲洗抽滤,真空干燥得粗多糖。

1.3.2 多糖分离纯化的路线

粗多糖→双氧水脱色→酶解和三氯乙酸正丁醇结合法脱蛋白→透析→冷冻干燥→乙醇沉淀→离心分离→乙醚、丙酮洗涤→DEAE-52 纤维素柱层析→0.3 mol/L 氯化钠洗脱→Sephacryl S-300 柱层析→纯度鉴定。

1.3.3 样品制备

脱色脱蛋白后的多糖通过 DEAE-52 纤维素柱层析,得到 BBP1 和 BBP2、BBP3 和 BBP4、BBP5 和 BBP6 六组分,BBP3 含量最高,BBP3 经 Sephacryl S-300 葡聚糖凝胶层析进一步分离纯化两个组分 BBP3-1 和 BBP3-2,因 BBP3-2 含量很低,故先未做

研究,BBP3-1 经过 Sephacryl S-300 葡聚糖凝胶层析柱检测验证为均一多糖。

1.4 纯度鉴定

1.4.1 多糖的紫外光谱(UV)分析

将多糖配成 1 mg/mL 的水溶液在紫外分光光度计上 400~200 nm 扫描。

1.4.2 Sephacryl S-300 葡聚糖凝胶过滤法

将少量纯品多糖溶于少量蒸馏水中,上 Sephacryl S-300 葡聚糖凝胶柱($\Phi 1.6 \times 50$ cm)。以蒸馏水洗脱,控制流速为 1 mL/min,部分收集体积为 4 mL/tub,以苯酚—硫酸法测 OD₄₉₀,做出其单一组分的鉴定洗脱曲线。

1.5 分子量的测定

高效液相色谱(HPLC)法测定多糖组分的分子量。

色谱条件:色谱柱:不锈钢色谱柱 TSK-G3000 7.8 mm(ID) \times 30.0 cm(L);柱温:35 $^{\circ}$ C;柱操作压力:1.6 Mpa;流动相:超纯净水;流速:0.5 mL/min;进样量:20 μ L。

将相对分子质量分别为 133800、410000、21400、10000 和 2500 的 Dextran 系列标准葡聚糖相继进样,记录各自的保留时间 tR,在相同色谱条件,将浓度约为 2.5 mg/mL 多糖进样,记录色谱曲线。用 Shimadzu CLASS-Vp 色谱工作站系统进行数据处理,测得蓝莓多糖各组分的相对分子质量。

用 HPLC 测定 T 系列标准品各自的保留时间 tR,以 tR 为横坐标,IgM(分子量对数值)为纵坐标绘制标准曲线(图 1)。待测 BBP3-1 按上述相同条件进样,测得 tR,查标准曲线得待测样品分子量。

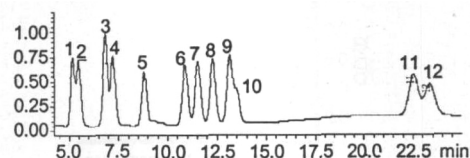


图 1 标准葡聚糖的保留时间—IgM 曲线

Fig. 1 The tR-IgM curve of standard dextrans

1.6 单糖组成

样品处理:将 20 mg 糖样加入到 1 mL 的 2 mol/L 三氟乙酸放入水解管中于 120 $^{\circ}$ C 水解 3 h;放入 60~80 $^{\circ}$ C 水汽条件下,滴加乙醇以除去剩余三氟乙酸,用 pH 试纸检测中性后抽干;加 0.12 mol/L 碳酸钠 1 mL,1 mg 肌醇,30 $^{\circ}$ C 处理 50 min,加 50 mg 硼氟化钾室温下处理 1.5 h;滴加 25% 乙酸中和至不产

生气泡 (pH = 6) ,加入阳性离子交换树脂除盐 2 h ,用蒸馏水 5 ~ 6 mL 冲洗过滤 ,滴加甲醇除酸至中性; 85 °C 条件下真空除去水分; 加 1 mL 正丙胺与 1 mL 无水吡啶 ,55 °C 条件下处理 30 min ,抽干后加入 0.5 mL 无水吡啶与 0.5 mL 乙酸酐 ,90 °C 处理 1 h ,抽干后用 1 mL 无水二氯甲烷 ,离心后取上清液进行气相检测。

色谱条件: GC-16A ,色谱柱 (3.2 mm × 3 m) ;柱温 180 °C ,氦气流速 45 mL/min ,氮气 40 mL/min ,FID 检测器 温度 240 °C ,进样量 0.8 μL。

根据 BBP3-1 水解样品的 GC 图与各单糖标准品的 GC 图对比 ,可判断单糖组成及摩尔比。

1.7 糖苷键及糖环构型确定

1.7.1 蓝莓多糖 BBP3-1 红外光谱分析

取经真空干燥的多糖各 1 ~ 2 mg 进行溴化钾压片 ,测定其红外光谱。

1.7.2 蓝莓多糖 BBP3-1 的核磁分析

将 BBP3-1 20 mg 分别溶于 0.5 mL D₂O 中 ,在 600 兆超导核磁共振仪上分别测其 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱。

2 结果与分析

2.1 纯度鉴定

2.1.1 紫外扫描检测

将多糖配成 1 mg/mL 的水溶液在紫外分光光度计上 400 ~ 200 nm 扫描。由紫外光谱图 2 可见 ,BBP3-1 在 280 和 260 nm 处无吸收 ,表明它不含蛋白、多肽及核酸。

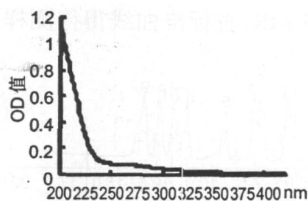


图 2 蓝莓多糖 BBP3-1 的紫外吸收光谱图

Fig. 2 UV-scanning pattern of pure polysaccharide BBP3-1 from blueberry

2.1.2 Sephacryl S-300 交联葡聚糖凝胶柱洗脱

根据凝胶的理论知识可知 ,样品中分子大的先流出凝胶柱 ,中等分子的后流出 ,分子最小的最后流出 ,这种现象叫分子筛效应。多糖是大分子 ,它的纯度标准不能用通常小分子的标准来衡量。因为即使是多糖纯品也存在微观不均一的问题 ,它的纯度只

代表某一多糖相似链长的平均配布。通常所说的多糖纯品实质上是一定分子量范围内的均一组分。多糖分子的大小和形状不同 ,在层析柱中移动速度也不同 ,从分部收集中出现的峰的多少和形状可以判断多糖的纯度。

将少量纯品多糖溶于少量蒸馏水中 ,上 Sephacryl S-300 葡聚糖凝胶柱 (Φ1.6 × 50 cm) 。以蒸馏水洗脱 ,控制流速为 1 mL/min ,部分收集体积为 4 mL/tub ,以苯酚-硫酸法测 OD₄₉₀ ,做出其单一组分的鉴定洗脱曲线。

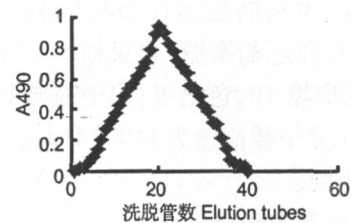


图 3 BBP3-1 凝胶层析曲线

Fig. 3 Elution pattern of BBP3-1 on SepHacryl S-300

从图 3 可以看出 ,蓝莓多糖 BBP3-1 经过凝胶柱纯化后 ,多糖的 Sephacryl S-300 交联葡聚糖凝胶柱的洗脱曲线均为单一洗脱峰 ,且峰形对称 ,结合紫外吸收光谱 ,证明他们均为单一组分。

2.2 分子量的测定

BBP3-1 的分子量分布见图 4。

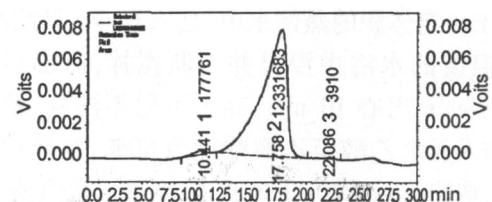


图 4 蓝莓多糖 BBP3-1 的 HPLC 图谱

Fig. 4 The HPLC atlas of blueberry polysaccharide BBP3-1

由图 4 分析得到: BBP3-1 的重均分子量 M_w 为 18643 Da ,数均分子量 M_n 为 9658 Da ,峰位分子量 M_p 为 3554 Da ,分子量分布宽度 (M_w/M_n) 为 3.186。多糖 BBP3-1 最佳峰面积为 98.271% ,其他杂峰面积为 0.312% 和 1.417% ,含量非常少 ,也进一步说明多糖 BBP3-1 的为纯度较高的多糖。

2.3 单糖组成

气相色谱分析结果见图 5 ,试验结果表明 BBP3-1 的单糖组成为 GalUA ,Xyl 和 Glu ,其摩尔比为 1:1.5:2。

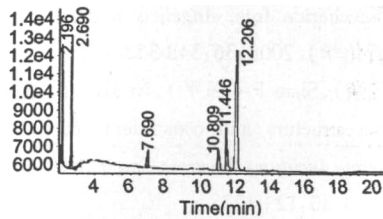


图5 蓝莓多糖 BBP3-1 水解液的气相色谱图谱
Fig. 5 GC chromatogram spectrum of blueberry polysaccharide BBP3-1 hydrolysate

2.4 糖苷键及糖环构型确定

2.4.1 蓝莓多糖 BBP3-1 红外光谱分析

蓝莓纯品多糖 BBP3-1 的红外光谱见图 6, 由图 6 可推知, 图中 3421.96 cm^{-1} 的吸收峰为 O-H 的伸缩振动, 2928.26 、 2360.28 cm^{-1} 和 2340.70 cm^{-1} 为 C-H 的伸缩振动和变角振动, 由以上三个特征峰至少可以判断出该物质为多糖。 1558.65 cm^{-1} 的吸收峰为 COOH 中的 -COO 的伸缩振动, 1398.26 cm^{-1} 的吸收峰为 C=O 对称伸缩振动, 可以推测该物质为含有糖醛酸的酸性多糖。 1102.43 cm^{-1} 的吸收峰为 -OH 的变角振动, 958.59 cm^{-1} 的吸收峰为直立端基 C-H 变角振动, 可推测该物质含有 β -D-吡喃葡萄糖或半乳糖, 在 810 cm^{-1} 和 870 cm^{-1} 处均无明显吸收峰, 说明它们均不含甘露糖, 这与气相色谱的分析结果相一致。 624.64 cm^{-1} 的吸收峰为 O-H 外向弯曲振动。

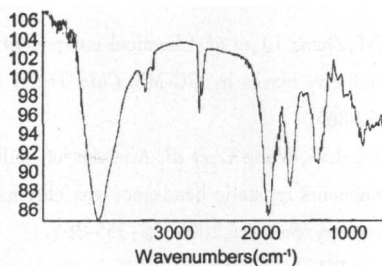


图6 蓝莓多糖 BBP3-1 的红外吸收光谱图
Fig. 6 IR spectrum of blueberry polysaccharide BBP3-1

2.4.2 蓝莓多糖 BBP3-1 的核磁分析

2.4.2.1 BBP3-1 的 ^1H NMR 分析

BBP3-1 的 ^1H NMR 的化学位移大部分处于 $\delta 5.0\text{ ppm}$ 以下, 说明 β 构型居多。 ^1H NMR 化学位移出现在 $\delta 2.01$, 表明有 O-乙酰基存在。 $\delta 3.40\text{ ppm}$ 处是 6-O-甲基- β -D-半乳糖的 6 位甲基的信号。

2.4.2.2 BBP3-1 的 ^{13}C NMR 分析

从图 7 中可以看出, 多糖 BBP3-1 ^{13}C NMR 的化

学位移高场区中 $\delta 19.0$ 为鼠李糖 C-6 位甲基的信号。 ^{13}C NMR 谱中, $\delta 62.91$ 为 C-6 位的吸收峰, 在 $\delta 60.01$ 处是葡萄糖的 6 位发生取代的共振峰, 说明此组分含 6 位取代的残基, 即该多糖糖链是以 1,6 连接的吡喃葡萄糖链, 这与红外分析结构相一致。

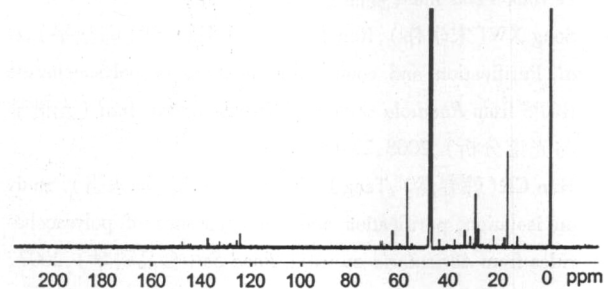


图7 蓝莓多糖 BBP3-1 的核磁共振图谱
Fig. 7 NMR spectrum of blueberry polysaccharide BBP3-1

3 结论

蓝莓多糖 BBP3-1 重均分子量 M_w 为 18643 Da, 数均分子量 M_n 为 9658 Da, 峰位分子量 M_p 为 3554 Da, 分子量分布宽度 (M_w/M_n) 为 3.186。 蓝莓多糖 BBP3-1 的气相色谱分析确定单糖组成为: 鼠李糖、半乳糖和葡萄糖, 其摩尔比为: 1:1.5:2。 红外光谱显示多糖 BBP3-1 具有多糖的特征吸收峰, 可推测多糖 BBP3-1 是含有 β -D-吡喃葡萄糖或半乳糖, 不含甘露糖, 含有糖醛酸的酸性多糖。 核磁共振分析, 可推测多糖 BBP3-1 是以 1,6 连接的吡喃葡萄糖链为主链, 含有鼠李糖、半乳糖和葡萄糖的 β 构型多糖。

参考文献

- 1 Wang H(王辉), Wang PY(王鹏云), Wang S(王蜀), et al. Development status and prospect of blueberry in China. *Res Agric Mod* (农业现代化研究) 2008, 29: 250-253.
- 2 Li LM(李丽敏), Hao QS(郝庆生), Li YD(李亚东). Consideration on the blueberry industry development in China. *J Anhui Agr Sci* (安徽农业科学) 2008, 36: 8546-8548.
- 3 Yang L(杨磊), Sun GJ(孙桂菊). Research progress of berry and berry juice. *Food Res Dev* (食品研究与开发) 2008, 29: 183-188.
- 4 Yang FS(阳佛送), Li XH(李雪华). Advances and methods in study on structure analysis of polysaccharides. *Food Sci Technol* (食品科技) 2008, 33: 200-203.
- 5 Li J(李俊), Huang Y(黄艳), He XC(何星存), et al. Study on the structure of polysaccharide from the fruits of *Siraitia*

- grosvenorii*. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技). 2008, 29: 169-172.
- 6 Zhang FH(张凡华), Shi BX(石宝霞), Zhang SM(张树明) *et al.* Study on extraction, purification and structure of low molecular weight polysaccharides from pumpkin. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技). 2008, 29(3): 93-95.
 - 7 Song XW(宋学伟), Ren L(任磊), Han YP(韩泳平) *et al.* Purification and composition analysis of polysaccharide RCPS from *Rhodiola crenulata*. *Spectrosc Spectr Anal* (光谱学与光谱分析) 2008, 28: 642-644.
 - 8 Han CR(韩春然), Tang J(唐娟), Ma YQ(马永强). Study on isolation, purification and characteristics of polysaccharides from *Auricularia auricula*. *Food Sci* (食品科学) 2007, 28(2): 53-55.
 - 9 Wu CL(武翠玲), Deng YK(邓永康), Meng YF(孟延发). Isolation, purification and structural investigation of polysaccharide from *Calvatia gigantea*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2008, 20: 1027-1030.
 - 10 Kang XJ(康学军), Qu JS(曲见松), Gu ZZ(顾忠泽). Analysis of *Angelica dahurica* polysaccharide. *Chin J Anal Chem* (分析化学). 2006, 34: 533-535.
 - 11 Sun YL(孙元琳), Shen RL(申瑞玲), Tang J(汤坚) *et al.* Hydrolytic characteristics and analysis of hydrolysis product of polysaccharide from *Angelica sinensis*. *Chin J Anal Chem* (分析化学). 2008, 36: 348-352.
 - 12 He JZ(何晋浙), Shao P(邵平), Ni HD(倪慧东) *et al.* Study on the structure and constituents of polysaccharide from *Ganoderma lucidum*. *Spectrosc Spectr Anal* (光谱学与光谱分析) 2010, 30: 123-127.
 - 13 Huang F(黄芳), Meng YW(蒙义文). Studies on polysaccharides with biological activity. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 1999, 11(5): 90-98.
 - 14 Anderson JW. Dietary fiber and human health. *Hortscience*, 1990, 25: 1488-1495.
 - 15 Kay CD, Holub BJ. The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *Br J Nutr* 2002, 88: 389-397.
 - 16 Hilz H, Bakx EJ, *et al.* Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries—characterisation in berries, juice and press cake. *Carbohydr Polym* 2005, 59: 477-488.
 - 17 Yamada H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: Structure and biological activity. *Carbohydr Polym*, 1994, 25: 269-276.
 - 18 Zhu Y, Pettolino F, Mau SL, *et al.* Characterization of cell wall polysaccharides from the medicinal plant *Panax notoginseng*. *Phytochemistry* 2005, 66: 1067-1076.

(上接第 1072 页)

- 6 Liao YT. The antimicrobial effect of mulberry leaves and the extract and isolate for its antimicrobial activities. Wuxi: Jiangnan University, Master 2007. 41-48.
- 7 Fan LS. Research on the antimicrobial of *Morus alba* L. leaves. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发) 2001, 13(4): 30-32.
- 8 Li JH, Chen DW. Analysis of volatile chemical composition in mulberry leaves using microwave assisted extraction associated with solid phase microextraction. *Chem Ind Prod*, 2007, 27: 107-110.
- 9 Wu CC, Wu ZW, Luo JB. Plant Pythoncider Research. Beijing: China Forestry Publishing House 2006. 203-205.
- 10 Li DS, Wang JH, Hu Z. Research on chemical composition of volatile oil of fresh mulberry leaves. *AA Biotic Resour* 2004, 26(2): 29-31.
- 11 Zhou YH, Li WG, Wang LS, *et al.* Analysis of the essential oil of mulberry leaves by GC-MS. *Guangxi Sci* 2005, 12: 50-51.
- 12 Sun L, Fu JH, Zhang LJ, *et al.* Chemical component of essential oil in mulberry leaves by GC-MS. *Chin Tradit Pat Med*, 2006, 28: 860-865.
- 13 Li WG, Zhang LW, Wang C, *et al.* Analysis of mulberry leaf volatile components by static headspace-gas chromatography-mass spectrometry. *Seri Sci* 2009, 35: 355-361.
- 14 Sun L, Yang WJ, Liu L. Study on fingerprint of mulberry leaves by GC-MS. *Chin J Chin Mater Med*, 2009, 34: 879-883.
- 15 Aburjai T, Natsheh FM. Plants used in cosmetics. *Phytother Res* 2003, 17: 987-1000.
- 16 Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res* 2007, 21: 308-323.
- 17 Zhan AY, You XL, Zhan YG. Biosynthetic pathway and applications of plant terpenoid isoprenoid. *Lett Biotechnol*, 2010, 21: 131-135.